

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-536235

(P2007-536235A)

(43) 公表日 平成19年12月13日(2007.12.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/663 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/663	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 19/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 7 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2007-511473 (P2007-511473)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成17年5月3日 (2005.5.3)		メルク エンド カムパニー インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月26日 (2006.12.26)		レーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/015187		MERCK & COMPANY INC
(87) 国際公開番号	W02005/107751		OPERATED
(87) 国際公開日	平成17年11月17日 (2005.11.17)		アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー
(31) 優先権主張番号	60/568, 525		ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ
(32) 優先日	平成16年5月6日 (2004.5.6)		ュー 1 2 6
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(71) 出願人	506368729
			メリアル・リミテッド
			アメリカ合衆国、ジョージア・30096
			-4640、ダルース、サテライト・ブー
			ルバード・3239
		(74) 代理人	100062007
			弁理士 川口 義雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イヌにおいて関節炎状態を治療するための方法

## (57) 【要約】

本発明は、イヌ科の動物の股関節または後膝における関節炎状態に対する疾病修飾効果を惹起するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。本発明は、イヌ科の動物において、股関節形成異常または後膝不安定性、股関節形成異常または後膝不安定性に随伴する疼痛、関節腫脹、寛骨臼の浅化、関節窩の狭細化、軟骨下骨硬化に対する疾病修飾効果を惹起し、骨棘形成を予防する、および関節破壊を予防するための方法にも関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

イヌ科の動物において股関節形成異常または十字靭帯損傷に関連した関節不安定性から生じるイヌにおける変形性関節症を治療するための方法であって、前記哺乳動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む、前記方法。

**【請求項 2】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート、リセドロネート、チルドロネート、ゾレンドロネートまたはこれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネートまたはこの医薬的に許容可能な塩である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

イヌ科の動物における股関節形成異常または十字靭帯損傷に関連した変形性関節症に随伴する疼痛を治療するための方法であって、前記哺乳動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む、前記方法。

**【請求項 5】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート、リセドロネート、チルドロネート、ゾレンドロネートまたはこれらの組み合わせである、請求項 4 に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネートまたはこの医薬的に許容可能な塩である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

イヌ科の動物における関節腫脹を低減するための方法であって、前記哺乳動物に治療有効量のビスホスホネートを投与することを含む、前記方法。

**【請求項 8】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート、リセドロネート、チルドロネート、ゾレンドロネートまたはこれらの組み合わせである、請求項 7 に記載の方法。

30

**【請求項 9】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネートまたはこの医薬的に許容可能な塩である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

イヌ科の動物の股関節における寛骨臼の浅化を予防するための方法であって、前記哺乳動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む、前記方法。

**【請求項 11】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート、リセドロネート、チルドロネート、ゾレンドロネートまたはこれらの組み合わせである、請求項 10 に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記ビスホスホネートが、アレンドロネートまたはこの医薬的に許容可能な塩である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

イヌ科の動物の股関節または後膝における骨棘形成を予防するための方法であって、前記哺乳動物に治療有効量のビスホスホネートを投与することを含む、前記方法。

50

## 【請求項 14】

前記ビスホスホネートが、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート、リセドロネート、チルドロネート、ゾレンドロネートまたはこれらの組み合わせである、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記ビスホスホネートが、アレンドロネートまたはこの医薬的に許容可能な塩である、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

イヌ科の動物における股関節形成異常または十字靭帯損傷に関連した変形性関節症を治療するための方法であって、前記哺乳動物にビスホスホネートおよび非ステロイド性抗炎症薬の治療有効量を投与することを含む、前記方法。

10

## 【請求項 17】

前記ビスホスホネートが、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート、リセドロネート、チルドロネート、ゾレンドロネートまたはこれらの組み合わせであり；および前記非ステロイド性抗炎症薬が、カルプロフェン、エトドラク、イブプロフェン、ケトプロフェン、メロキシカム、ナブロキセン、セレコキシブ、デラコキシブ、エトリコキシブ、フィロコキシブ、ルマリコキシブ、パレコキシブ、ロフェコキシブまたはバルデコキシブである、請求項 16 に記載の方法。

20

## 【請求項 18】

前記ビスホスホネートが、アレンドロネートまたはこの医薬的に許容可能な塩であり、前記非ステロイド性抗炎症薬が、ロフェコキシブである、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記ビスホスホネートが、アレンドロネートまたはこの医薬的に許容可能な塩であり、前記非ステロイド性抗炎症薬が、フィロコキシブである、請求項 17 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

変形性関節症（OA）は、疼痛、軟骨喪失および関節硬直を特徴とする変性関節疾患である。全年齢のイヌを襲うが、高齢のイヌに最も優勢である一般的な疾患である。これは一次疾患（一般的な消耗の結果）である場合もあり、または二次疾患（外傷、感染、骨折未治癒もしくは発育異常の結果）である場合もある。

30

## 【0002】

股関節形成異常は、大腿骨頭と寛骨臼の間の変形により大腿骨骨頭を過度に動かせる関節不安定性が生じる、イヌの発育異常である。これは、イヌ、特に大型種に一般的な病気である。遺伝的要素はあるが、正確な原因は不明である。この疾病は、遺伝し得るが、この異常の発現は、栄養、成長速度、肥満および運動などの要因による影響を非常に大きく受ける。

40

## 【0003】

最初、股関節形成異常は、大腿骨頭を寛骨臼の球の周りに過度に動かせるため関節の締まりがなくなっただよに見える。極端な場合、関節が亜脱臼する。次第に、これらの異常な関節の相互作用により、対向する骨の末端を覆う関節軟骨の損傷および侵食が生じる。疼痛、関節腫脹、関節窩の狭細化、象牙質化（骨の上の骨の連結）、および関節への構造変化（寛骨臼の浅化、大腿骨骨頭リモデリングおよび骨棘発生を含む）がある。

## 【0004】

この疾病に随伴する疼痛は、非ステロイド性抗炎症薬の使用により様々な有効度で制御することができる。麻薬を使用すると、より強い疼痛寛解を達成することができる。しかし、これらの療法は、純粹に一時的なものであり、変形性関節症の進行を防止しない。結

50

局、大腿骨骨頭を除去するための外科手術または股関節全置換術が、疼痛寛解もたらずのに有効な唯一の治療と考えられているに違いない。

【0005】

十字靭帯の断裂または損傷は、通常、運動中の後膝関節の突然の捻転または過伸展に起因して発生する。これは、一般に、前十字靭帯のものを含み、相当痛い場合があり、ならびに他の関節損傷を含む。靭帯が断裂されると、結果として生じる関節不安定性が、関節肥厚、半月板軟骨変性、関節窩の狭細化および関節周囲骨棘形成をはじめとする関節変性変化を導く。

【0006】

十字靭帯断裂と診断されると、関節を安定させるために手術が指示される。手術が行われないか、不成功に終わったイヌでは、慢性関節不安定性が変形性関節症の発現を導く可能性が高い。後膝関節にかかわる変形性関節症に罹患しているイヌでは、股関節形成異常を治療するために使用される鎮痛薬の選択が指示される。鎮痛薬は不快感を和らげるが、一次疾患を治療しない。

10

【発明の開示】

【0007】

本発明は、イヌ科の動物において関節炎状態に対する疾病修飾効果を惹起するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。本発明は、イヌ科の動物において、股関節形成異常、股関節形成異常に伴う疼痛、関節腫脹、寛骨臼の浅化、軟骨下骨硬化に対する疾病修飾効果を惹起し、骨棘形成を予防する、および関節破壊を予防するための方法にも関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

(発明の詳細な説明)

本発明は、イヌ科の動物において関節炎状態に対する疾病修飾効果を惹起するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

【0009】

本発明は、イヌ科の動物において十字靭帯損傷に関連した股関節形成異常または後膝不安定性の結果生じる変形性関節症を治療するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

30

【0010】

本発明は、イヌ科の動物において股関節形成異常または後膝不安定性に伴う疼痛を治療するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

【0011】

本発明は、イヌ科の動物において関節腫脹を低減するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

【0012】

本発明は、イヌ科の動物において股関節寛骨臼の浅化を予防するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

40

【0013】

本発明は、イヌ科の動物において骨棘の形成を予防するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

【0014】

本発明は、イヌ科の動物において軟骨下骨硬化を治療するための方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

【0015】

本発明は、イヌ科の動物において関節の劣化を予防するための方法に関し、この方法は

50

、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量を投与することを含む。

【0016】

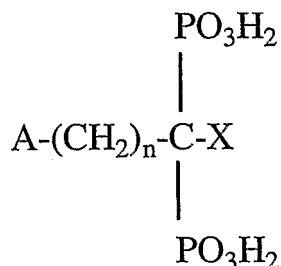
本発明は、イヌ科の動物において関節炎状態に対する疾病修飾効果を惹起する方法に関し、この方法は、このイヌ科の動物にビスホスホネートの治療有効量および非ステロイド性抗炎症薬の治療有効量を投与することを含む。さらに、本発明は、ビスホスホネートおよび非ステロイド性抗鎮痛薬を含む医薬組成物に関する。

【0017】

「ビスホスホネート」は、化学式：

【0018】

【化1】



(式中、nは、0から7の整数であり、AおよびXは、H、OH、ハロゲン、NH<sub>2</sub>、SH、フェニル、C1-C30アルキル、C3-C30分枝状またはシクロアルキル、2個または3個のNを含有する二環式環構造、C1-C30置換アルキル、C1-C10アルキル置換NH<sub>2</sub>、C3-C10分枝状またはシクロアルキル置換NH<sub>2</sub>、C1-C10ジアルキル置換NH<sub>2</sub>、C1-C10アルコキシ、C1-C10アルキル置換チオ、チオフエニル、ハロフェニルチオ、C1-C10アルキル置換フェニル、ピリジル、フラニル、ピロリジニル、イミダゾリル、イミダゾピリジニルおよびベンジルから成る群より独立して選択され、例えば、nが0であるときには、AとXの両方がHおよびOHからは選択されず、またはAおよびXは、これらが結合している炭素原子もしくは原子と一緒に、C3-C10環を形成する)

の化合物を含むが、これらに限定されない。

【0019】

上記化学式において、アルキル基は、直線状であってもよいし、分枝状であってもよいし、環状であってもよいが、この化学式にとって十分な原子が選択されることを条件とする。C1-C30置換アルキルは、多種多様な置換基を包含し得、この非限定的な例としては、フェニル、ピリジル、フラニル、ピロリジニル、イミダゾリル、NH<sub>2</sub>、C1-C10アルキルまたはジアルキル置換NH<sub>2</sub>、OH、SHおよびC1-C10アルコキシから成る群より選択されるものが挙げられる。

【0020】

上記化学式は、Aおよび/またはX置換基について、複合カルボン酸、芳香族およびヘテロ原子構造も包含すると解釈し、この非限定的な例としては、ナフチル、キノリル、イソキノリル、アダマンチルおよびクロロフェニルチオが挙げられる。

【0021】

このビスホスホネートの医薬的に許容可能な塩および誘導体もここでは有用である。塩の非限定的な例としては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、および一、二、三または四-C1-C30-アルキル置換アンモニウム塩から成る群より選択されるものが挙げられる。好ましい塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩およびアンモニウム塩から成る群より選択されるものである。ナトリウム塩は、さらに好ましい。誘導体の非限定的な例としては、エステル、水和物およびアミドから成る群より選択されるものが挙げられる。

【0022】

本発明の治療薬に関して本明細書で用いる用語「ビスホスホネート(単数)」および「

10

20

30

40

50

ビスホスホネート（複数）」は、ジホスホネート、ビスホスホン酸およびジホスホン酸、ならびにこれらの物質の塩および誘導体も包含する意味を持つ。ビスホスホネート（単数）またはビスホスホネート（複数）に関して特定の命名法の使用は、特別な指示がない限り、本発明の範囲を限定する意味はない。通常、当業者によって現在用いられている命名法がまちまちであるため、本発明でのビスホスホネート化合物の比重量またはパーセンテージは、本明細書中で別様に指示しない限り、酸活性重量をベースでのものである。例えば、「アレンドロン酸活性重量ベースで、アレンドロネート、この医薬的に許容可能な塩およびこれらの混合物から成る群より選択される骨吸収阻害性ビスホスホネートの約5 mg」というフレーズは、選択されるビスホスホネート化合物の量が、5 mgのアレンドロン酸を基に計算されることを意味する。

10

**【0023】**

ここで有用なビスホスホネートの非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：アレンドロネート（これは、アレンドロン酸とも呼ばれる）、アレンドロン酸ナトリウムまたはアレンドロン酸一ナトリウム・三水和物、4-アミノ-1-ヒドロキシブチリデン-1,1-ビスホスホン酸および4-アミノ-1-ヒドロキシブチリデン-1,1-ビスホスホン酸一ナトリウム・三水和物は、1990年5月1日発行のKieczykowskiらの米国特許第4,922,007号；1991年5月28日発行のKieczykowskiらの米国特許第5,019,651号；1996年4月23日発行のDauerらの米国特許第5,510,517号；1997年7月15日発行のDauerらの米国特許第5,648,491号に記載されており、これらの特許は、これら全文、本明細書に参照して組み込まれる。

20

**【0024】**

1990年11月13日発行のIsomuraらの米国特許第4,970,335号に記載されているような、シクロヘプチルアミノメチレン-1,1-ビスホスホン酸、YM 175、山之内製薬株式会社（Yamanouchi）（以前はシマドロネートとして知られていた、インカドロネート）。この特許は、この全文、本明細書に参照して組み込まれる。

**【0025】**

1,1-ジクロロメチレン-1,1-ジホスホン酸（クロドロネート）およびこの二ナトリウム塩（クロドロネート、Procter and Gamble）は、ベルギー特許第672,205号（1996）およびJ. Org. Chem. 32, 4111（1967）に記載されており、これらの文献は両方とも、これら全文、本明細書に参照して組み込まれる。

30

**【0026】**

1-ヒドロキシ-3-(1-ピロリジニル)-ピロリデン-1,1-ビスホスホン酸（EB-1053）。

**【0027】**

1-ヒドロキシエタン-1,1-ジホスホン酸（エチドロネート）。

**【0028】**

BM-210995、Boehringer-Mannheim（イバンドロネート）としても知られている、1-ヒドロキシ-3-(N-メチル-N-ペンチルアミノ)プロピリデン-1,1-ビスホスホン酸は、1990年5月22日発行の米国特許第4,927,814号に記載されている。この特許は、この全文、本明細書に参照して組み込まれる。

40

**【0029】**

1-ヒドロキシ-2-イミダゾ-(1,2-a)ピリジン-3-イルエチリデン（ミノドロネート）。

**【0030】**

6-アミノ-1-ヒドロキシヘキシリデン-1,1-ビスホスホン酸（ネリドロネート）。

50

## 【0031】

3 - (ジメチルアミノ) - 1 - ヒドロキシプロピリデン - 1 , 1 - ビスホスホン酸 (オルパドロネート)。

## 【0032】

3 - アミノ - 1 - ヒドロキシプロピリデン - 1 , 1 - ビスホスホン酸 (パミドロネート)。

[ 2 - ( 2 - ピリジニル ) エチリデン ] - 1 , 1 - ビスホスホン酸 (ピリドロネート) は、米国特許第 4 , 7 6 1 , 4 0 6 号に記載されている。この特許は、この全文、本明細書に参照して組み込まれる。

## 【0033】

1 - ヒドロキシ - 2 - ( 3 - ピリジニル ) - エチリデン - 1 , 1 - ビスホスホン酸 (リセドロネート)。

## 【0034】

1989年10月24日発行のBreliereらの米国特許第4,876,248号に記載されているような、(4-クロロフェニル)チオメタン - 1 , 1 - ジホスホン酸 (チルドロネート)。この特許は、この全文、本明細書に参照して組み込まれる。

## 【0035】

1 - ヒドロキシ - 2 - ( 1 H - イミダゾール - 1 - イル ) エチリデン - 1 , 1 - ビスホスホン酸 (ゾレドロネート)。

## 【0036】

ビスホスホネートの非限定的な例としては、アレンドロネート、シマドロネート、クロドロネート、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート、オルパドロネート、パミドロネート、ピリドロネート、リセドロネート、チルドロネート、およびゾレンドロネート、ならびにこれらの医薬的に許容可能な塩およびエステルが挙げられる。特に好ましいビスホスホネートは、アレンドロネート、特に、アレンドロン酸のナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムまたはアンモニウム塩である。好ましいビスホスホネートのよい例となるものは、アレンドロン酸のナトリウム塩、特に、アレンドロン酸のナトリウム塩水和物である。この塩は、完全モル数の水で水和されていてもよいし、完全でないモル数の水で水和されていてもよい。好ましいビスホスホネートのさらによりよい例となるものは、アレンドロン酸のナトリウム塩水和物であり、特に、この塩水和物が、アレンドロン酸一ナトリウム・三水和物の場合である。

## 【0037】

2つまたはそれ以上のビスホスホネート活性体の混合物を利用できることは理解される。

## 【0038】

## 定義

「関節炎状態(単数)」または「関節炎状態(複数)」は、炎症性病変が関節に限定されるまたは関節のいずれかの炎症性状態である疾病を指す。

## 【0039】

「関節腫脹」は、関節窩への滲出に起因する関節の外周の膨張、または関節囊および周囲構造の外側肥厚を指す。

## 【0040】

「寛骨臼の浅化」は、大腿骨頭が正常に対向している盃状窩の深さを減少させ、盃状窩の形状を平坦化するような、寛骨臼の形状のリモデリングを指す。

## 【0041】

「関節窩の狭細化」は、関節内につながっている対向する骨の間の距離の見かけの減少を指す。これは、骨の関節面を覆う軟骨の厚さが減少した結果であり、この減少は、これらの骨を正常な状態より互いにずっと近接した状態にさせる。

## 【0042】

本明細書で用いる「軟骨下骨硬化」は、骨密度および軟骨下領域の容積の増加を意味す

10

20

30

40

50

る。

【0043】

本明細書で用いる「骨棘」は、関節縁に位置する新たに形成された骨構造を指し、これらの発生は、OA進行の最終段階と強く関連している。現行の仮説は、骨棘は活性化した骨膜から生じ、これが新たな軟骨造生を導き、軟骨内性骨形成プロセスによりこれらが最終的には骨になるというものである。

【0044】

本明細書で用いる「関節破壊」は、関節軟骨の破壊を指す。

【0045】

用語「疾病修飾効果」は、疾病の進行を遅速、阻止または予防することができる作用因子を指す。例えば、変形性関節炎の場合、疾病修飾効果は、軟骨の喪失の遅速および骨棘形成の予防を包含しうる。

10

【0046】

「非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)」は、炎症の形成を制限する非ステロイド性治療薬を指す。NSAIDの非限定的な例としては、カルプロフェン、エトドラク、イブプロフェン、ケトプロフェン、メロキシカム、ナプロキセンおよび選択的シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤(COX-2阻害剤)が挙げられるが、これらに限定されない。COX-2阻害剤の非限定的な例としては、セレコキシブ、デラコキシブ、エトリコキシブ、フィロコキシブ、ルマリコキシブ、パレコキシブ、ロフェコキシブおよびバルデコキシブが挙げられる。

20

【0047】

本明細書で用いる用語「組成物」は、指定成分を指定量で含む製品、ならびに指定量の指定成分の併用により直接または間接的に得られるあらゆる製品を包含すると解釈する。

【0048】

本明細書で用いる用語「治療有効量」は、研究者、獣医、医者または他の臨床家によって探求されつづける、組織、系、動物または人間において生体応答または薬物応答を惹起する活性化化合物または医薬の量を意味する。

【0049】

本明細書で用いる疾病の「治療 (treatingまたはtreatment)」という用語は、疾病の予防、すなわち、疾病に罹患していてもよいし疾病の素因を有していてもよいが、この疾病症状をまだ経験していなが提示していないイヌ科の動物において疾病の臨床症状を発現しないようにすること；疾病の抑制、すなわち、疾病もしくはこの臨床症状の発現を阻止もしくは低減すること；または疾病の軽減、すなわち、疾病またはこの臨床症状を退行させることを包含する。

30

【0050】

本明細書で用いる用語「医薬的に許容可能な塩」は、無機または有機酸とで形成されるような、本発明の化合物の従来のおりの非毒性塩を包含する。例えば、従来のおりの非毒性塩としては、無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸など、から誘導されるもの、ならびに有機酸、例えば酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ-安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸、トリフルオロ酢酸など、から調製される塩が挙げられる。上で説明した医薬的に許容可能な塩および他の典型的な医薬的に許容可能な塩の調製は、Bergら、「Pharmaceutical Salts」, J. Pharm. Sci., 1977: 66: 1-19によってさらに十分に説明されている。本発明の化合物の医薬的に許容可能な塩は、塩基部分または酸部分を含有する本発明の化合物から、従来の方法によって合成することができる。一般に、塩基性化合物の塩は、イオン交換クロマトグラフィーによって、または適する溶媒も

40

50



しくは溶媒の様々な組み合わせの中で所望の塩形成性無機もしくは有機酸の理論量もしくは過剰量と遊離塩基を反応させることによって調製することができる。同様に、酸性化合物の塩は、適切な無機または有機塩基との反応によって形成される。

【0051】

使用効果

本発明の組成物および方法は、関節炎状態に対する疾病修飾効果の惹起に有用であり、特に、股関節形成異常に随伴する疼痛の治療、関節腫脹の低減、ならびに寛骨臼の浅化、軟骨下骨吸収、骨棘形成および最終的には関節破壊/劣化の予防を含む、イヌ科の動物における変形性関節症および股関節形成異常に対する疾病修飾効果の惹起に有用である。

【0052】

本発明の方法は、イヌ科の動物における関節炎状態の治療において予想外の疾病修飾効果を有する。

【0053】

本発明の組成物は、錠剤、カプセル（これらは、各々、持続放出性調合物または持効性調合物を含む）、ピル、粉末、顆粒、エリキシル、ペースト、チンキ、滅菌溶液もしくは懸濁液、シロップ、着香トリーツ（*flavored treats*）および乳剤などのような経口剤形で投与することができる。同様に、本組成物は、静脈内用（ボラスもしくは注入）、腹腔内用、局所用（例えば、点眼剤）、鼻腔内用、吸入用、皮下用、筋肉内用もしくは経皮用（例えば、パッチ）の形態、計量エアロゾルもしくは液体スプレー剤、滴剤、アンプル、自己注射装置または座剤で投与することもでき、これらはすべて、医薬技術分野の当業者には周知の使用形態である。所望される組成物の有効だが毒性でない量を使用することができる。本組成物は、経口、非経口、鼻腔内、舌下もしくは直腸内投与のためのものであり、または吸入法もしくは通気法による投与のためのものである。本発明の組成物の調合は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed., 1995に記載されているような、当該技術分野から知られている方法によって適便に行うことができる。

【0054】

本発明の組成物を利用する薬剤投与計画は、被験者のタイプ、種、年齢、体重、性別および病状、治療すべき状態の重症度、投与経路、被験者の腎および肝機能、ならびに利用される特定の化合物またはこの塩をはじめとする様々な因子に従って選択される。通常技術の獣医または臨床家は、この状態を予防し、この状態に対抗する、またはこの状態を阻止するために必要な薬物の有効量を容易に決定し、処方することができる。

【0055】

有利なことに、本発明の化合物は、年4回、月1回、週1回もしくは1日1回の用量で投与ことができ、または全日用量を1日2回、3回もしくは4回の分割用量で投与することができる。さらに、本発明の化合物は、適する鼻腔内用ビヒクルの局所使用により鼻腔内用の形態で投与ことができ、または当業者に周知の経皮パッチの形態のものを使用して経皮経路により投与することができる。経皮送達系の形態で投与するための投薬量の投与は、勿論、この薬剤投与計画を通じて間欠的ではなく継続的であるだろう。

【0056】

用量は、1日1回の用量で投与ことができ、または全日用量を1日2回、3回もしくは4回の分割用量で投与することができる。さらに、投与のために選択される個々の化合物の特性を基に、用量を少ない頻度で、例えば週1回、週2回、月1回などで投与することができる。単位投薬量は、勿論、投薬頻度が低いほどこれに応じて多くなるだろう。

【0057】

ビスホスホネートの正確な投薬量は、投薬スケジュール、選択された特定のビスホスホネートの経口効力、このイヌ科の動物の年齢、サイズ、性別および状態、治療すべき疾患の性質および重症度、ならびに他の関連する医学的および身体的要因によって変化するであろう。イヌ科の動物のためのビスホスホネートの有効経口用量は、典型的には体重のkg当たり約1.5から約20,000  $\mu$ g、好ましくは体重のkg当たり約10から約1

10

20

30

40

50

0, 000  $\mu$ g である。

【0058】

代替の薬剤投与計画では、ビスホスホネートは、1日1回ではなく間隔をあけて投与、例えば、週1回投薬、週2回投薬、2週間に1回投薬および1ヶ月に2回投与され得る。週1回の投薬計画では、アレンドロン酸一ナトリウム・三水和物は、約2.5 mg / 週から約280 mg / 週の投薬量で投与されるであろう。用量の非限定的な例としては、140 mg / 週および280 mg / 週が挙げられる。ビスホスホネートは、月1回、6ヵ月ごと、年1回、またはもっと低い頻度でさえも投与することができる。国際公開パンフレット第01/97788号(2001年12月27日発行)および同第01/89494号(2001年11月29日発行)参照。

10

【0059】

本発明のさらなる側面によると、ビスホスホネートと指定の状態の治療に適する1つもしくはそれ以上の他の薬理活性薬剤とを併用して上述の状態のいずれかを治療することが望ましい場合がある。ビスホスホネートおよび他の薬理活性薬剤(複数を含む)は、被験者に同時に、逐次的に、または併用で投与することができる。例えば、本化合物は、他の活性薬剤(複数)と直接併用することができ、または他の薬剤(複数を含む)の投与前、投与と同時にもしくは投与後に投与することができる。一般に、そうした併用に用いるための公知治療薬の現在利用可能な剤形が、適するであろう。

【0060】

本発明の組成物および方法は、所望の治療効果が達成されるまで、投与および実施される。

20

【0061】

本発明で利用することができるビスホスホネートの特定は、過度の経験がなくても、本明細書において説明するような、当該技術分野では周知の方法論によって容易に判定することができる。

【0062】

アッセイ

材料および方法

変形性関節症モデルおよび治療 - すべての手順は、Merck Research Lab.における研究機関内動物管理使用委員会ガイドライン(Insti-  
tutional Animal Care and Use Committee Guide) 30  
に従って行った。95匹の週齢20週の雄Sprague-Dawleyラット(ニュー  
ジャージー州、タコニック(Taconic))を実験に従って使用した。変形性関節炎  
(OA)モデルは、週齢20週の雄ラット膝関節に、または月齢7から10ヶ月の雄NZ  
白ウサギに外科手術で誘導した。簡単に言うと、動物をイソフルランにより麻酔した。右  
膝関節を削り落とし、ヨウ素で消毒し、内側膝蓋骨アプローチ(medial para-  
patellar approach)により露出させた。膝蓋骨を横にずらし、膝を完  
全に屈曲している状態にした。すべての手術操作手順は、手術用ルーペを使用して行った  
。前十字靭帯(ACL)をマイクロ剪刀で横に切開した。ACLの完全な横切開を確認す  
るために、ラックマン試験を行った。外科手術後、この関節面を滅菌食塩液で洗浄し、  
Vicry 4-0(英国、エディンバラ(Edinburgh)のEthicon)、吸  
40  
収性縫合糸およびモノフィラメント4-0ナイロン糸(英国、エディンバラのEthi-  
con)を使用して囊と皮膚の両方を縫合した。擬似手術では、膝蓋骨の亜脱臼および食塩  
水洗浄後、創傷を層ごとに閉じた。塩酸ブプレノルフィン(0.1 mg / kg)(英国、  
ハル(Hull)のReckitt & Colman Products Ltd.)  
を鎮痛薬として与えた。動物を軟らかい床敷きのプラスチックケージ内で自由に動けるよ  
うにした。

【0063】

試験化合物は、皮下注射または経口投薬のいずれかで投与した。薬物は、予防モードでは手術前に投薬した。治療モードでは、薬物を手術の1または2週間後に投薬した。終点

50

は、組織分析、組織形態測定法および血清マーカーの評価であった。すべての研究において、動物は、以下のグループを常に含んでいた：ACL横切開とビヒクル、ACLTと低および高用量の薬物、擬似手術とビヒクル、ならびに擬似手術と高用量の薬物。動物は、外科手術の2および10週間後にCO<sub>2</sub>で犠牲にした。両方の時点に関して、剖検の3日前にラットに10mg/kgのカルセインを注射した。別の研究では、擬似またはACLT手術操作を受け、薬物治療を受けたまたは受けていない同じグループの動物をTGF- $\alpha$ に使用した。これらの動物は、外科手術の2週間後に犠牲にした。

#### 【0064】

肉眼的形態学、組織標本および組織学 - - 右関節離脱後、大腿骨と頸骨の両方を注意深く洗浄して筋肉がない状態にし、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の4%パラホルムアルデヒド(ニュージャージー州のFisher Scientific)中で24時間固定した。遠位大腿骨の肉眼的外観を1:4 Nikkorレンズ(日本の株式会社ニコン(Nikon))を備えたデジタルカメラ(DIX、日本の株式会社ニコン)により撮影して、骨棘形成を評価した。次に、帯鋸(ドイツ、ノルデルシュテット(Norderstedt)のEXAKT Technologies, Inc.)を用いて、頸骨を前側切断で内側側副靭帯に添って関節面の中央で半分に切断した。前方部は、パラフィン包埋のためにさらに24時間、再び4%パラホルムアルデヒドに浸漬した。後方部は、70%エタノールに変え、次いで、メチルメタクリレートに包埋した。以前に説明されているようなマッソン三色染色法で、5 $\mu$ m厚の切片を染色した。Gruber, H. E., G. J. Marshall, L. M. Nolasco, M. E. Kirchen, および D. L. Rimoin, 1988, 「人間の骨および軟骨におけるアルカリおよび酸ホスファターゼ実験証明: 固定間隔およびメタクリレート包埋の効果 (Alkaline and acid phosphatase demonstration in human bone and cartilage: effects of fixation interval and methacrylate embedments)」, Stain Technol. 63: 299-306、ならびに Yamamoto, M., J. E. Fisher, M. Gentile, J. G. Seedor, C. T. Leu, S. B. Rodan, および G. A. Rodan, 1998, 「インテグリンリガンドエキスタチンは、卵巣摘出マウスおよびラットにおいて骨減少を予防する (The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats)」, Endocrinology. 139: 1411-9 参照。無作為に割り付けられた識別番号で試験片を標識して、続く測定の間、調査者にグループ名が判らないようにした。

#### 【0065】

パラフィン包埋については、前に説明されているように、組織を0.5Mエチレンジトリロ四酢酸溶液(pH7.6、ニュージャージー州のFisher Scientific)中で7から10日間脱灰し、次いで、漸増エタノール系列で処理し、次いで、切りレンで処理した後、パラフィンワックス(ニュージャージー州のFisher Scientific)に包埋した。Nakase, T., K. Takaoka, K. Hirakawa, S. Hirota, T. Takemura, H. Onoue, K. Takebayashi, Y. Kitamura, および S. Nomura, 1994, 「インビボでの骨格組織の成長中のオステオネクチン、オステオポンチンおよびオステオカルシンmRNAの発現の交代 (Alterations in the expression of osteonectin, osteopontin and osteocalcin mRNAs during the development of skeletal tissues in vivo)」, Bone Miner. 26: 109-22、ならびに Hayami, T., N. Endo, K. Tokunaga, H. Yamagiwa, H. Hatano, M. Uchida, および H. E. Takahashi, 2000, 「大腿部頸部の成長におけるラットコラゲナーゼ(MMP-13)mRNA発現の時空的变化 (Spatiotemporal change of rat co

llagenase (MMP-13) mRNA expression in the development of the rat femoral neck)」, J Bone Miner Metab. 18:185-93 参照。

【0066】

パラフィン包埋試験片を切断し、組織学分析および免疫組織化学により検査した。パラフィン切片を、プロテオグリカン含量について、トルイジンブルー-O (0.2%トルイジンブルー-O / 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.0) で染色した。時折、切片を、以前に説明されているように、破骨細胞局在について酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色でも染色した。Nakamura, Y., A. Yamaguchi, T. Ikeda, および S. Yoshiki, 1991, 「酸性ホスファターゼ活性は、シアヌル酸塩化物での前処理により、破骨細胞系統において優先的に検出される (Acid phosphatase activity is detected preferentially in the osteoclastic lineage by pre-treatment with cyanuric chloride)」, J Histochem Cytochem. 39:1415-20 参照。

10

【0067】

病理組織学的スコア (修正マンキンスコア (modified Mankin score)) - 半定量的組織病理学的格付けを修正マンキン採点法に従って行った。この採点法は、多少の修正を伴う、OAの研究において十分に確立されている格付けシステムである。Coke, M.A., R.A. Read, B. Guillou, および P. Ghosh, 2000, 「アボガドおよび大豆不飽和脂肪酸 (ASU) による変形性関節症のヒツジ膝関節半月板切除モデルにおける関節軟骨および軟骨下骨病理の修飾 (Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU))」, Osteoarthritis Cartilage. 8:404-11; Little, C., S. Smith, P. Ghosh, および C. Bellenger, 1997, 「羊における膝関節外側半月板切除により誘導される変形性関節症モデルにおける関節変化の組織形態学および免疫組織化学的評価 (Histomorphological and immunohistochemical evaluation of joint changes in a model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy in sheep)」, J Rheumatol. 24:2199-209; Wenz, W., S.J. Breusch, J. Graf, および U. Stratmann, 2000, 「イヌ科の動物の関節症モデルにおけるヒアルロنانの関節内適用後の超微細構造所見 (Ultrastructural findings after intraarticular application of hyaluronan in a canine model of arthropathy)」, J Orthop Res. 18:604-12 参照。

20

30

40

【0068】

通常、マンキンスコアは、構造、軟骨細胞数、軟骨細胞クラスター形成、プロテオグリカン含量 (トルイジンブルー-O についての染色性)、ならびに軟骨における血管侵入をはじめとする軟骨下板および / またはタイドマーク (tidemark) 変化を含む、5つのサブカテゴリーから成る。軟骨への血管侵入は、マッソン三色染色法を用いて独立して評価したので、本発明者らは、このカテゴリーをマンキンスコアから省いた。各サンプルにおいて、100 μm 離れた3つの切片を測定した。可能な合計スコアは26であり、採点は、一人の観察者が盲検で5点測定尺度 (Cokeら, 2000) に従って行った。低い合計スコアは、小さな変性軟骨病変に一致し、これに対して高い合計スコアは、より顕著な軟骨病変の指標となる。トルイジンブルー-O 染色法の染色性に関して、本発明者

50

らは、以前に説明されている (Littleら, 1997) 専門用語を用いる。「軽度」は、無傷関節面でトルイジンブルー - O染色が減少した場合に用い、「中等度」は、表面細動および中央領域への (しかし、中央領域より下までの) 破裂伸長に関連してトルイジンブルー - O染色が減少した場合に用い、ならびに「重度」は、軟骨を石灰化軟骨レベルまで喪失した場合に用いた。

#### 【0069】

骨組織形態測定法 - 組織学的パラメータの定量化のために、本発明者らは、Image Pro plus (バージョン4、メリーランド州のMedia Cybernetics) 画像分析プログラムを使用した。関節軟骨および軟骨下骨の画像は、4倍対物レンズを備えたオリンパス蛍光顕微鏡 (BX51、日本) を使用して検査し、CCD/TVGBカラービデオカメラ (RT Slider SPOT、ミシガン州のDiagnostic Instrument, Inc.) を使用して記録した。

10

#### 【0070】

内側と外側両方の頸骨プラトーの組織形態測定法測定値は、1つの膝関節につき、100  $\mu$ m 間隔を空けた2つの別の切片で決定した。軟骨下領域は、OA発現の際に影響を受けると報告されているので、本発明者らは、組織面積当たりの軟骨下骨体積を測定するためにマクロを開発した。内側または外側いずれかの頸骨プラトーからの2つの領域、深さ600  $\mu$ m  $\times$  幅800  $\mu$ mを測定し、この頸骨プラトーの中央を、頸骨面の幅に従って半自動で決定した。測定すべき領域を確実に定めるために、長方形の頂部は関節軟骨の表面に沿って常に水平に整列し、この側面は頸骨の中心線に沿って垂直に整列した。2つの領域からの内側または外側頸骨プラトーについてのデータを併せ、1グループにつき6つの膝の測定値をグループごとに平均した。

20

#### 【0071】

軟骨下領域における骨梁骨体積 (BV/TV: 類骨および石灰化骨が占める軟骨内骨および骨髓区画のパーセンテージ) は、命名法に従う組織形態測定法によって測定し、ASBMRガイドラインに従って計算した。Parfitt, A. M., M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, および R. R. Recker, 1987, 「骨組織形態測定法: 命名法、記号および単位の標準化 (Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units)」, Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res. 2: 595 - 610 参照。軟骨下領域における活性骨リモデリング表面を検出するために、本発明者らは、剖検の3日前にラットにカルセイン (10 mg/kg) も注射した。プラスチック包埋切片での標識石灰化表面は、上で説明したのと同じオリンパス蛍光顕微鏡を使用して検分することができる。

30

#### 【0072】

石灰化軟骨への血管侵入 - - 石灰化軟骨への血管侵入は、以前に説明されているように、石灰化軟骨が軟骨下骨髓窩と接触する回数を計数することにより定量した。O'Connor, K. M., 1997, 「減量によるラットの膝関節での関節軟骨におけるタイドマーク前進の加速 (Unweighting accelerates tidemark advancement in articular cartilage at the knee joint of rats)」, J Bone Miner Res. 12: 580 - 9 参照。100  $\mu$ m 間隔を空けた2つの切片からの結果を測定した。

40

#### 【0073】

破骨細胞スコア - - 石灰化軟骨および骨棘領域におけるTRAP陽性細胞を計数した。各サンプルにおいて100  $\mu$ m 間隔を空けた2つの切片からTRAP陽性細胞の数を測定し、次いで、1グループにつき6つの膝から平均した。

#### 【0074】

50

骨棘スコアおよびデータ - - 骨棘は、頸骨プラトーにおける関節縁で発生する骨および軟骨の造生と定義した。骨棘形成の事変（骨棘スコア）を評価するために、各膝関節からの、100 μm離れた3つのパラフィン包埋切片（頸骨の前方部）および2つのプラスチック包埋切片（頸骨の後方部）を含む5つの切片の合計骨棘数を、評価した。各骨棘の表面積は、イメージプロ分析を用いてマッソン三色染色切片で手作業により決定した。2つの切片（各切片は100 μm離れている）を評価した。

【0075】

COMP、CTX-IおよびCTX-IIの血清および尿中レベル - - 各剖検時、外科手術の2および10週間後、心臓穿刺から血液を得た。血清サンプルを採取し、アリコートで、-70 で凍結した。以前に説明されているような酵素結合イムノソルベントアッセイ変法を用いて、AnaMar Medical AB（スウェーデンのウプサラ（Uppsala））により、血清軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質（COMP）を判定した。Larsson, E., A. Müssener, D. Heinegard, L. Klarekog, および T. Saxne, 1997, 「コラーゲン関節炎に罹患しているラットにおけるオリゴマーマトリックスタンパク質および骨シャロタンパクの血清中レベルの増加 (Increased serum levels of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in rats with collagen arthritis)」, Br J Rheumatol. 36: 1258-61、ならびに Saxne, T., および D. Heinegard, 1992, 「軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質：滑液および血液において検出できる軟骨代謝回転の新規マーカー (Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood)」, Br J Rheumatol. 31: 583-91 参照。すべての判定は、二重重複で行った。

【0076】

外科手術の2週間後、個々の動物の代謝ケージから、24時間尿サンプルを回収した。サンプルを遠心分離し、アリコートで、-70 で凍結した。I型コラーゲンのC末端テロペプチドからの骨関連分解産物についてのアッセイ（CTX-I/Ratlaps、デンマークのNordic Bioscience Diagnostics）を、この製造業者のインストラクションに従って、本発明者らの実験施設で行った。II型コラーゲンの軟骨関連C-末端テロペプチドについてのアッセイ（CTX-II/Carilaps）は、デンマークのNordic Bioscience Diagnosticsによって行われた。尿クレアチニン判定は、正常尿量についての試験として各サンプルで測定された。同サンプルにおけるクレアチン濃度に正規化した後のCTX-IおよびCTX-II値が報告された。

【0077】

免疫組織化学 - - 組織切片をキシレン中で脱パラフィン化し、漸増エタノール中で水和し、次いで、37 で20分間、500 U/mLの精巢性ヒアルロニダーゼ（ミズーリ州のSigma）で処理した。次に、抗ラットCD31 mAb（マサチューセッツ州、Endogen）または以前に記載されているような（Fernandez, T., S. Amoroso, S. Sharpe, G. M. Jones, V. Bliskovski, A. Kovalchuk, L. M. Wakefield, S. J. Kim, M. Potter, および J. J. Letterio, 2002, 「新規リガンド依存性メカニズムによる形質転換成長因子ベータシグナリングの破壊」 Disruption of transforming growth factor beta signaling by a novel ligand-dependent mechanism」, J Exp Med. 195: 1247-55 参照）TGF-1、2および3の活性化形のみを認識する抗活性化TGF-（R&D）のいずれかを使用して、組織切片を、以前に記載されているように（Hayami, T., H. Funaki, K. Yaoeda,

K. Mitui, H. Yamagiwa, K. Tokunaga, H. Hatano, J. Kondo, Y. Hiraki, T. Yamamoto, L. T. Duong, および N. Endo, 2003, 「実験的変形性関節症の初期段階における軟骨由来の血管形成抑制因子コンドロモジュリン-I デクレアーゼの発現 (Expression of the cartilage-derived anti-angiogenic factor Chondromodulin-I decreases in the early stage of experimental osteoarthritis)」, J. Rheumatol. (in press) 参照)、抗-MMP-13 Ab、抗-MMP-9 Abと共に一晩、4 でインキュベートした。CD31免疫染色法では、0.3% Tween 20を含有するPBS中ですすいだ後、これらをビオチン結合抗マウスAb (LSAB2キット、カリフォルニア州のDako) と共に10分間インキュベートし、次いで、アルカリ性ホスファターゼ結合ストレプトタビジン (カリフォルニア州のDako) と共に10分間インキュベートした。これらの切片をPBSですすぎ、ファストレッド基質系 (カリフォルニア州のDako) を使用して5分間現像し、ヘマトキシリンで後染色した。MMP-9/MMP-13およびTF- $\beta$  Abでの二重標識免疫組織化学染色を以前に説明されているように行った。Hayami, T., H. Funaki, K. Yaoeda, K. Mitui, H. Yamagiwa, K. Tokunaga, H. Hatano, J. Kondo, Y. Hiraki, T. Yamamoto, L. T. Duong, および N. Endo, 2003, 「実験的変形性関節症の初期段階における軟骨由来の血管形成抑制因子コンドロモジュリン-I デクレアーゼの発現 (Expression of the cartilage-derived anti-angiogenic factor Chondromodulin-I decreases in the early stage of experimental osteoarthritis)」, J. Rheumatol. (in press) 参照。簡単に言うと、組織切片をTGF- $\beta$  mAbと共にインキュベートし、続いて、AP結合抗マウスAbと共にインキュベートし、APブルー (米国、カリフォルニア州のVector Laboratories) で青色に現像した。これらを0.3% Tween 20を含有するPBSで1時間、2回洗浄し、抗MMP-9またはMMP-13ポリクローナル抗体と共にインキュベートし、続いてHRP-抗ウサギAb (カリフォルニア州のDAKO) と共にインキュベートし、0.5 mg/mLの3,3'-ジアミノベンジン四酢酸により褐色に現像した。陰性対照として、一次Abを用いずに、または一次抗体の代わりにマウスmAb IgGを用いて、同じ手順を行った。

#### 【0078】

頸骨プラトー/膝蓋器官培養からの上清におけるTGF- $\beta$  についてのミンク肺上皮成長阻害アッセイ - ACLTまたは擬似手術し、薬物治療したまたはしていない関節から、膝蓋および頸骨プラトーを単離した。膝蓋の関節離開および切開後、頸骨を軟組織から注意深く除去した。関節軟骨および軟骨下骨組織を骨鋸 (イリノイ州のBuehler Isomet) により関節面から480  $\mu$ m厚で切り取った。切開した膝蓋および頸骨プラトーを24ウエル培養皿に移し、0.1% BSA - MEMで3回洗浄し、次いで、同培地中、37、5% CO<sub>2</sub> 下でインキュベートした。12時間インキュベートした後の上清を回収し、-70 で冷凍した。ミンク肺上皮細胞バイオアッセイを使用することにより、以前に説明されているように、活性TGF- $\beta$  を測定した。Docagne, F., N. Colloch, V. Bougueret, M. Page, J. Paput, M. Tripier, P. Dutartre, E. T. MacKenzie, A. Buisson, S. Komesli, および D. Vivien, 2001, 「可溶性形質転換成長因子-ベータ (TGF- $\beta$ ) I型受容体は、TGF- $\beta$  ベータ応答を模倣する (A soluble transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor mimics TGF-beta responses)」, J. Biol. Chem. 276: 46243-50 参照。簡単に言うと、96ウエル Cytostar シンチレーティングマイクロブ

レート（ニュージャージー州のA m e r s h a m）に、E - M E M、ピルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸を含有する10% P B S、中、細胞数10,000/ウエルで、ミンク肺細胞（M v 1 L u、メリーランド州のA T C C）をプレーティングした。24時間後、T G F - 1を最終濃度として - M E M（1：4）で希釈し、ウエルを二重重複にするために対照として50  $\mu$  Lを添加し、続いて、調製培地（50  $\mu$  L/ウエル）を添加した。20時間後、[<sup>14</sup>C - メチル] - チミジンを各ウエルに添加して、0.5  $\mu$  C i / m Lの最終希釈にした。4時間後と24時間後にプレートを計数した。報告データは、24時間の時点からのものであった。

#### 【0079】

統計学的解析 - - S t a t v i e w（ノースカロライナ州のS A S I n s t i t u t e I n c .）を使用して、統計学的比較を作成した。表1から3のすべてのデータは、平均  $\pm$  S Dとして示した。結果は、平均  $\pm$  S E Mとして表す。グループ間の差の有意性は、治療グループ全体にわたって分散を分析するために一元配置分散分析（A N O V A）で評価し、ならびに指示されている場合を除き治療グループ平均値と比較するために最小有意差のフィッシャー解析（フィッシャー P L S D）で評価した。値の差は、p値が0.05未満であったとき、有意とみなした。

#### 【実施例】

#### 【0080】

以下の実施例によって、本発明の範囲内の実施態様をさらに説明し、実証する。これらの実施例は、単に説明のために与えるものであり、本発明の制限とみなすべきではない。本発明の精神および範囲を逸脱することなくこの多くの変形が可能であるからである。

#### 【0081】

##### 医薬錠剤組成物

1994年10月25日発行のB e c h a r dらの米国特許第5,358,941号（これは、この全文、本明細書に参照して組み込まれる）に記載されているような標準的な混合および調合技術を用いて、錠剤を調製する。

#### 【0082】

アレンドロン酸活性ベースで約6.5 mgのアレンドロン酸一ナトリウム・三水和物を含有する錠剤を、次の成分相対重量を用いて調製する。

#### 【0083】

##### 【表1】

成分	84mg錠剤当たり	4000錠当たり
アレンドロン酸一ナトリウム・三水和物	6.5255mg	26.10 g
無水ラクトース, NF	35.66mg	142.64 g
微結晶性セルロース, NF	40.0 mg	160.0 g
ステアリン酸マグネシウム, NF	0.5 mg	20 g
クロスカルメロースナトリウム, NF	1.0 mg	4.0 g

#### 【0084】

結果として生じる錠剤は、この必要があるイヌ科の動物において股関節形成異常または十字靭帯損傷に関連した変形性関節症を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

#### 【0085】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む錠剤を調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネート含有する錠剤を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する錠剤を同様に調製する。

10

20

30

40

50



## 【0086】

牛肉ベースでないチュアブルトリーツ ( Chewable Treats )

結果として生じるチュアブルトリーツは、この必要があるイヌにおいて変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0087】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含むチュアブルトリーツを調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含むチュアブルトリーツを同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含むチュアブルトリーツを同様に調製する。

10

## 【0088】

## 【表2】

成分	パーセントW/W
アレンドロン酸ナトリウム・三水和物	2
大豆タンパク質微粉	42
プロピレングリコール	6
水	22
人工牛肉香味料	2
コーンスターチ	25
クエン酸	1

20

## 【0089】

## 懸濁液

結果として生じる懸濁液は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0090】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む懸濁液を調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含む懸濁液を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含む懸濁液を同様に調製する。

30

## 【0091】

## 【表3】

成分	パーセントW/W
アレンドロン酸ナトリウム・三水和物	1.3%w/w
コロイド状二酸化ケイ素	3.0
アルファートコフェロール	0.2
魚油	95.5

40

## 【0092】

## 溶液

結果として生じる溶液は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0093】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む溶液を調製する。

## 【0094】

50

また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有する溶液を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する溶液を同様に調製する。

【0095】

【表4】

成分	パーセントW/V
アレンドロン酸ナトリウム・三水和物	1.3%w/v
クエン酸	1.0
クエン酸ナトリウム	0.5
バタースコッチ香味料	0.2
精製水	97.0

10

【0096】

軟膏

結果として生じる軟膏は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

【0097】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む軟膏を調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有する軟膏を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する軟膏を同様に調製する。

20

【0098】

【表5】

成分	パーセントW/W
アレンドロン酸ナトリウム・三水和物	1.3%w/w
レシチン	3.0
麦芽シロップ	45.0
白色ワセリン	50.7

30

【0099】

ゲル

結果として生じるゲルは、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

【0100】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含むゲルを調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有するゲルを同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有するゲルを同様に調製する。

40

【0101】

## 【表 6】

成分	パーセントW/W
アレンドロン酸一ナトリウム・三水和物	1.3%w/w
クエン酸	1.0
クエン酸ナトリウム	0.5
ポロキサマー	20.0
プロピレングリコール	20.0
ベンジルアルコール	2.0
精製水	57.0

10

## 【0102】

## ペースト

結果として生じるペーストは、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0103】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含むペーストを調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有するペーストを同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有するペーストを同様に調製する。

20

## 【0104】

## 【表 7】

成分	パーセントW/W
アレンドロン酸一ナトリウム・三水和物	1.3%w/w
カルボキシメチルセルロースナトリウム	2.0
ケイ酸アルミニウムマグネシウム	2.0
メチルパラベン	0.18
プロピルパラベン	0.02
ソルビトール溶液	20.0
プロピレングリコール	20.0
精製水	54.5

30

## 【0105】

## 経皮送達用組成物

結果として生じる組成物は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0106】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む組成物を調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有する組成物を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する組成物を同様に調製する。

40

## 【0107】

## 【表 8】

成分	パーセントW/V
アレンドロン酸ナトリウム三水和物	1.3%w/v
ブチルヒドロキシアニソール	0.02
ポリソルベート80	3.0
ジエチレングリコールモノブチルエステル	5.0
n-メチルピロリドン	90.7

## 【0108】

経皮送達用組成物（皮膚パッチ）

結果として生じる組成物は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。 10

## 【0109】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む組成物を調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有する組成物を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する組成物を同様に調製する。

## 【0110】

## 【表 9】

成分	パーセントW/W
アレンドロネート基剤	5.0%w/w
アルコール	15.0
ヒドロキシプロピルセルロース	1.0
鉱物油	0.2
ポリイソブチレン	十分に
エチレンビニルアセテート	十分に

20

30

## 【0111】

注射用製剤（静脈内 / 筋肉内、皮下 / 腹腔内）

結果として生じる注射用製剤は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0112】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む注射用製剤を調製する。

## 【0113】

また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有する注射用製剤を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する注射用製剤を同様に調製する。

40

## 【0114】

## 【表 10】

成分	Percent W/V
アレンドロン酸ナトリウム・三水和物	2.0%w/v
クエン酸ナトリウム	0.5
ベンジルアルコール	2.0
エデト酸ナトリウム	0.01
ピロ重亜硫酸ナトリウム	0.02
注射用蒸留水	95.5

10

## 【0115】

## 鼻腔内送達用組成物

結果として生じる組成物は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0116】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む組成物を調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有する組成物を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する組成物を同様に調製する。

20

## 【0117】

## 【表 11】

成分	パーセントW/W
アレンドロン酸ナトリウム・三水和物	2.0%w/w
カルボキシメチルセルロースナトリウム	0.2
デキストロース	0.9
塩化ベンジルアルコニウム	0.01
ポリソルベート80	3.0
塩酸	0.01
精製水	93.9

30

## 【0118】

## 持続放出性錠

結果として生じる錠剤は、この必要がある哺乳動物において変形性関節症病変を抑制し、すなわち治療するまたはこのリスクを減少させるための本発明の方法による投与に有用である。

## 【0119】

同様に、アレンドロン酸活性重量ベースでアレンドロン酸の他の相対重量を含む錠剤を調製する。また、適切な活性レベルで他のビスホスホネートを含有する錠剤を同様に調製する：例えば、シマドロネート、イバンドロネート、ネリドロネート、オルパンドロネート、リセドロネート、ピリドロネート、パミドロネート、ゾレンドロネート、およびこれらの医薬的に許容可能な塩。加えて、ビスホスホネートの組み合わせを含有する錠剤を同様に調製する。

40

## 【0120】

## 【表 1 2】

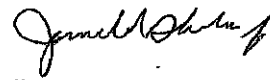
成分	パーセントW/W
アレンドロン酸ナトリウム・三水和物	1.3%w/w
クエン酸	1.0
クエン酸ナトリウム	0.5
セルロースポリマー	1.0
コーンスターチ	5.0
グリコール酸ナトリウムデンプン	5.0
二酸化チタン	0.5
バニリン	0.5
硬化ヒマシ油	6.0
ポビドン	5.0
アセチル化モノグリセリド	1.0
微結晶性セルロース	18.0
ラクトース	55.2

10

## 【0 1 2 1】

上に例示した成分に加えて、調合物は、必要に応じて追加の適する緩衝剤、着色剤、分散剤、香味料、安定剤および保存薬も含有することができる。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application N° PCT/US05/15187
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 31/445, 31/19 US CL : 514/320, 166 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/320, 166 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 5,869,471 (HOVANCIK et al) 9 February 1999 (9.2.1999), column 7, lines 15-65; column 8, lines 55-65; column 40, lines 40-65.	1-2, 4-5, 7-8, 10, 13-14, 16-18
Y	US 5,412,141 (NUGENT) 2 May 1995 (2.5.1995), column 8, lines 45-65.	1-19 1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document number of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 18 August 2005 (18.08.2005)		Date of mailing of the international search report <b>23 SEP 2005</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Leonard M. Williams  Telephone No. 571-272-1600

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74) 代理人 100140523

弁理士 渡邊 千尋

(74) 代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 トンプソン, ドナルド

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72) 発明者 ハンスン, ピーター

アメリカ合衆国、ジョージア・30096-4640、ダルス、サテライト・ブルバード・3239

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 DA34 MA01 MA04 NA14 ZA08 ZA96 ZB11 ZC61